苦橙不同部位挥发油成分及抗氧化与抗菌活性分析

刘亚男[1]，文雅丽[2]，陈霞蔚[1]，林家逊[1]，许有瑞[1*]

（1. 桂林医学院 药学院 广西 桂林 541199；2. 桂林医学院科学实验中心 广西 桂林 541199）

摘 要：为较全面地研究苦橙（*Citrus aurantium* var. *amara*）全植株挥发油成分及抗氧化与抗菌活性，该文以其叶、花、幼果为材料，采用水蒸气蒸馏法（SD）结合气相色谱-质谱（GC-MS）联用技术分析其成分，并利用体外测试方法比较了三者的抗氧化与抗菌活性。结果表明：（1）从苦橙叶、花及其幼果挥发油中共分离鉴定出 94 种成分，三个部位的挥发油成分种类及含量存在一定差异，其中 13 种为共有成分。从叶中鉴定出 34 种成分，含量较高的有芳樟醇（30.51%）、*α*-松油醇（14.78%）；从花中鉴定出 32 种成分，主要成分有芳樟醇（57.59%）和 *d*-柠檬烯（16.15%）；从幼果中鉴定出 69 种挥发性成分，主要含有 *d*-柠檬烯（25.55%）和*γ*-萜品烯（10.48%）。（2）苦橙三个部位挥发油表现出不同程度的抗氧化活性，其中苦橙幼果、叶及花的挥发油对 ABTS 的 IC_{50} 值分别为 2.6、5.1、8.2 mg·mL^{-1}，对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值分别为 2.7、4.3、5.0 mg·mL^{-1}，幼果挥发油的抗氧化活性最好。（3）苦橙幼果挥发油对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌表现出的抗菌活性也强于叶和花。该研究结果可为苦橙叶、花及其幼果中挥发油的提取利用提供理论依据。

关键词：苦橙，挥发油，GC-MS，抗氧化活性，抗菌活性

中图分类号：Q946　　　　**文献标识码：**A

Volatile components and their antioxidant and antibacterial activities in different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*

LIU Yanan[1], WEN Yali[2], CHEN Xiawei[1], LIN Jiaxun[1], XU Yourui[1*]

(1. *School of Pharmacy*, *Guilin Medical University*, Guilin 541199, Guangxi, China; 2. *Science Experiment Center*, *Guilin Medical University*, Guilin 541199, Guangxi, China)

Abstract: In order to analyze chemical constituents and compare the antioxidant and antibacterial activities of essential oils from different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*, the essential oils from leaves(L.O), flowers(F.O), and young fruits(YF.O) were extracted respectively by steam distillation and their chemical compositions were identified by GC-MS. Moreover, their antioxidant and antibacterial activities were evaluated and compared using *in vitro* methods. The results were as follows: (1) A total of 94 volatile components were isolated and identified from the volatile oil of leaves, flowers and young fruits, there were some differences between three parts, of which 13 were common components. 34 components were identified from the leaves, and the major compounds were linalool (30.51%) and *α*-terpineol (14.78%); 32 components were identified in the flower, the main components were linalool (57.59%) and *d*-limonene (16.15%); 69 volatile components were identified in the young fruits, mainly containing *d*-limonene (25.55%) and *γ*-terpene (10.48%). (2) The volatile oil from different parts showed different antioxidant activities. The IC_{50} values of volatile components from young fruits, leaves and flowers to ABTS

基金项目：广西自然科学基金（2017GXNSFAA198237）[Supported by Guangxi Natural Science Foundation Project (2017GXNSFAA198237)]。

第一作者：刘亚男(1995-)，硕士研究生，研究方向为药物研发与转化，（E-mail）medicallyn@163.com。

*__通信作者：__许有瑞，博士，讲师，研究方向为中药活性成分的研究与开发，（E-mail）xuyourui1980@ sina.com。

were 2.6, 5.1 and 8.2 mg·mL^{-1} respectively, and the IC_{50} values to DPPH free radicals were 2.7, 4.3 and 5.0 mg·mL^{-1} respectively. The antioxidant activity of young fruits was better than that of leaves and flowers. (3) The volatile oil from the young fruit showed certain antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, which was better than the leaves and flowers. The results can provide a theoretical basis for the extraction and utilization of the essential oils from the different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*.

Key Words: *Citrus aurantium* var. *amara*, essential oils, GC-MS, antioxidant activity, antibacterial activity

苦橙（*Citrus aurantium* var. *amara*）为芸香科（Rutaceae）柑橘属常绿带刺小乔木，为酸橙（*Citrus aurantium*）的一个栽培变种，中国广泛种植于长江以南地区（黄善松等，2016）。作为中药枳实与枳壳的一个重要来源，其具有理气宽中、行滞消胀、破气消积、化痰散痞之功效。现代研究表明苦橙可用于焦虑症、肺癌和前列腺癌等多种疾病的治疗（Suntar et al., 2018；叶一丹等，2019）。芸香科植物普遍含挥发油，主要分为萜烯类、芳香族、脂肪族和含硫含氮类化合物（靖会和佐建锋，2005；陈丽艳和崔志恒，2006），而苦橙挥发油中含有芳樟醇、柠檬烯、甲酸芳樟酯、α-松油醇、橙花醇、3-蒈烯等成分（Ali et al., 2015），具有浓郁的铃兰香味、清新的柠檬香和柑橘味，广泛应用于香料、日化和食品等方面（Stohs et al., 2017），已进入美国食品香料和萃取物制造者协会（FEMA）的食用香料名录，同时也已被《中国食品添加剂使用卫生标准》纳入允许食品香料。更为重要的是从苦橙中提取到的具有独特芬芳气味的橙花油（又名 Neroli），被 FDA 认定为 GRAS (generally regarded as safe)，在伊朗、突尼斯、阿尔及利亚、摩洛哥、埃及、法国等地被用来缓解多种疼痛、抑郁、痉挛等（Haj Ammar et al., 2012；Choi et al., 2014）。

植物资源是指来源于植物的器官（如根、茎、叶、花、果实、种子）或植物的全株，近年来不少研究者也开始关注药用植物的非药用部位或全株，检测其成分和效用差异，以实现资源的全面利用。柑橘属植物果实在外果皮的表层生长有大量油囊，合成并储存具有独特芳香气味的挥发油，被广泛应用于芳香治疗、食品加工、化妆品制备等领域（樊荣，2012）。而苦橙药用部位主要是其未成熟果实，已有研究仅对苦橙叶和花中挥发油成分进行了分析，并进行了抗炎和抗菌活性比较，但其幼果挥发油成分种类、相对含量和抗氧化活性尚不明确，而将其幼果作为挥发油提取原料也未见报道，为了全面开发苦橙全植株，避免造成资源浪费，达到综合开发其地上部分的目的。本研究采用水蒸气蒸馏法分别对苦橙叶、花及其幼果的挥发油进行提取，并应用 GC-MS 分析其化学成分。此外，通过 DPPH 法和 ABTS 法对苦橙不同部位挥发油的抗氧化活性进行研究，并对其抗菌活性进行评价。研究结果可为苦橙叶、花及其幼果中挥发油的提取利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

材料：苦橙叶、花和幼果来源于浙江省金华市浙八味中药材市场，以上材料由桂林医学院黄德青副教授鉴定为苦橙（*Citrus aurantium* var. *amara*）的叶、花、幼果。

试剂：ABTS（纯度≥98%）、DPPH（纯度为 99%）、BHT（纯度为 99%）均购于 Sigma-Aldrich 公司；琼脂粉购自成都科龙化学试剂有限公司；无水乙醇购于南宁西陇化工有限责任公司，所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Aglient7890B-5977B 型气相色谱-质谱联用仪（美国安捷伦公司）；UV-PC1800 型紫外-可见分光光度计（上海美谱达科学仪器有限公司）；DLSB-5L/30 低温冷却循环泵（巩义市

予华仪器有限责任公司)；BT224S 型电子分析天平(北京 Satorius 天平有限公司)；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 苦橙不同部位挥发油的提取

1.3.1.1 苦橙叶挥发油的提取

依照 2020 年版《中国药典》四部通则中 2204 挥发油测定法提取苦橙叶挥发油（L.O）。取干燥苦橙叶 80 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶中，按料液比 1：10（g·mL^{-1}）加入 800 mL 蒸馏水，置于电炉上加热使微沸，连续提取 5 h，得微黄绿色油状物，冷却后收集得 0.780 2 g 挥发油。连续提取五次后得到苦橙叶挥发油供试品 3.804 g，密封，于 4 ℃冰箱中避光保存，挥发油单次提取率为 0.95%。

1.3.1.2 苦橙花挥发油的提取

取盐浸苦橙花 280 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶，按料液比 1：3（g·mL^{-1}）加入 840 mL 蒸馏水，按 1.3.1.1 中方法提取苦橙花挥发油（F.O），连续提取四次，待冷却后收集苦橙花挥发油供试品 3.056 g，密封，置于 4 ℃冰箱中避光保存，苦橙花挥发油单次提取率为 0.27%。

1.3.1.3 苦橙幼果挥发油的提取

取干燥苦橙幼果粉末 200 g 于 1 000 mL 圆底烧瓶，按料液比 1：4（g·mL^{-1}）加入 800 mL 蒸馏水，按 1.3.1.1 中方法提取苦橙幼果挥发油（YF.O），连续提取四次得黄绿色油状物，冷却后收集得 2.708 g 苦橙幼果挥发油供试品，密封，于 4 ℃冰箱中避光保存，苦橙幼果挥发油单次提取率为 0.34%。

1.3.2 GC-MS 分析条件

1.3.2.1 GC 条件

气相色谱条件：HP-5MS 石英毛细柱（30 m × 0.25 mm × 0.25 μm）；柱温 45~200 ℃，45 ℃维持 3 min，20 ℃·min^{-1} 升温至 200 ℃，维持 10 min；柱流量为 1.2 mL·min^{-1}；进样口温度为 250 ℃；柱前压 9.466 7 psi，进样量 1 μL；不分流；载气为高纯氦气。

1.3.2.2 MS 条件

质谱条件：电离方式 EI；电子能量 70 eV；传输线温度 250 ℃；离子源温度 230 ℃；四级杆温度 150 ℃；质量范围 50~550。

1.3.3 体外抗氧化活性研究

1.3.3.1 ABTS 自由基清除率的测定

根据文献（孔钰婷等，2021）中的方法，精密称取 6.62 mg $K_2S_2O_8$ 于 10 mL 棕色容量瓶，用蒸馏水溶解并定容至刻度，摇匀后得 2.45 mmoL·L^{-1} $K_2S_2O_8$ 溶液。另精密称取 38.41 mg ABTS 于 10 mL 棕色容量瓶，用蒸馏水溶解并定容至刻度，摇匀后得 7 mmoL·L^{-1} ABTS 溶液。将以上两种溶液按 1:1 体积混合定容至 25 mL 棕色容量瓶中，室温下暗处反应 13 h，然后用无水乙醇稀释至其在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02。在具塞试管中加入 1 mL 不同浓度挥发油乙醇溶液，5 mL ABTS 工作液，涡旋混匀，置于室温下避光反应 6 min 后于 734 nm 处测量样品吸光度（A_i）。用无水乙醇代替样品溶液按上述方法测定对照品溶液吸光度（A_c）。用无水乙醇代替 ABTS 工作液按上述方法测定空白吸光度（A_o）。以 BHT 为阳性对照，平行试验 3 次取平均值，按式（a）计算：

$$\text{ABTS 自由基清除率\%(SA\%)}=\left(1-\frac{A_i-A_o}{A_c}\right)\times 100\% \quad \text{(a)}$$

1.3.3.2 DPPH 自由基清除率的测定

根据文献（王定美等，2021）中的方法，精密称取 DPPH 标准品 4 mg 于 50 mL 棕色容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容至刻度，摇匀后得到 0.2 mmo·L^{-1} DPPH 母液，置于冰箱中

冷藏保存。准确量取 DPPH 母液 10 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中，用无水乙醇稀释并定容，摇匀后得到 0.02 mmoL·L^{-1} 的 DPPH 工作液。在具塞试管中依次加入不同浓度的挥发油乙醇溶液 2.0 mL 和 DPPH 工作液 4.0 mL，涡旋混匀，于暗处反应 30 min 后在 517 nm 处测定样品吸光度（A_i）。用无水乙醇代替样品溶液按上述方法测定对照品溶液吸光度（A_c）。用无水乙醇代替 ABTS 工作液按上述方法测定空白吸光度（A_o）。以 BHT 为阳性对照，平行试验 3 次，按式（b）计算：

$$\text{DPPH 自由基清除率\%(SD\%)}=\frac{Ac-(Ai-Ao)}{Ac}\times 100\% \quad \text{（b）}$$

1.3.4 抑菌实验

1.3.4.1 抗菌活性研究

本研究选用桂林医学院基础医学院微生物实验室提供的 3 种致病菌大肠杆菌（ATCC 25922）、金黄色葡萄球菌（ATCC 25923）和铜绿假单胞菌（ATCC 27853）。抽取供试菌液（1×10^8 CFU·mL^{-1}）200 μL 置于 LB 培养基中，通过经典的圆盘扩散试验评估 3 种精油的抗菌敏感性（Rota et al., 2008）。用等量 DMSO 制备阴性对照，用庆大霉素作阳性对照。在 37 ℃孵育 24 h 后，通过测量抑菌圈的大小来评估抑菌活性。

1.3.4.2 最低抑菌浓度（MIC）的测定

采用肉汤微量稀释法测定精油对供试菌的 MIC（Zhang et al., 2017）。试验菌悬液用无菌生理盐水调至 1×10^7 CFU·mL^{-1}。不同部位精油在 DMSO 中采用 2 倍稀释法配制，加入 LB 肉汤培养基中，得到（1～32）μg·mL^{-1} 的最终浓度。最后将 20 μL 菌悬液转移到 96 孔培养板上。阳性对照品和阴性对照品分别用相同体积的庆大霉素溶液和空白溶液制备，不加供试品。培养板 37 °C 孵育 24 h。MIC 定义为无肉眼可见菌生长的测试样品的最低浓度。

1.4 数据处理

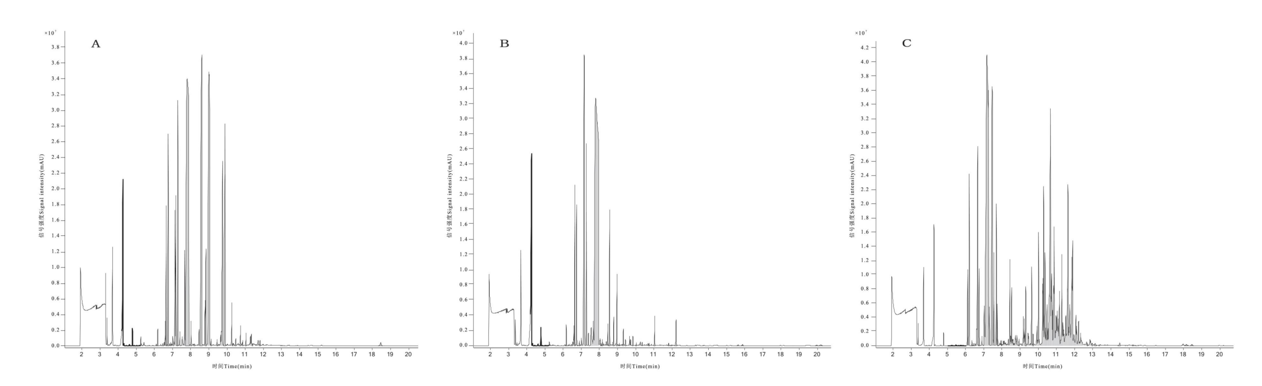
利用峰面积归一化法对其挥发性成分进行定量分析（魏婧等，2022）。所有数据均以 3 次重复测量的平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 化学成分分析

苦橙不同部位挥发油经 GC-MS 分析后，得到图 1 的总离子流图。对分离出的各挥发性成分采用 NIST17.L 标准谱库计算机检索定性分析，经质谱解析，苦橙三个部位中共鉴定出 94 种挥发性成分，其中叶 34 种，花 32 种，幼果 69 种挥发性成分。

苦橙不同部位挥发油的化学成分有一定差异，叶和花中含量最高的均是芳樟醇，分别为 30.51%、57.59%；幼果中含量较高的有 *d*-柠檬烯（25.55%）和*γ*-萜品烯（10.48%）。苦橙叶挥发油中醇类化合物含量最多，占总化学成分 55.37%，酯类占 22.71%，烯类占 20.25%；主要化学成分有芳樟醇（30.51%）、*α*-松油醇（14.78%）、甲酸芳樟酯（11.60%）、橙花醇（8.56%）、3-蒈烯（7.39%）、*β*-蒎烯（4.45%）等。苦橙花挥发油中醇类化合物成分最多，占总化学成分 65.70%，其次是烯类占 30.81%，酯类占 2.02%；主要化学成分有芳樟醇（57.59%）、*d*-柠檬烯（16.15%）、3-蒈烯（5.35%）、桧烯（4.36%）、*α*-松油醇（3.32%）、*β*-蒎烯（3.26%）等。苦橙幼果挥发油中烯类成分最多，占 75.43%，醇类占 17.31%，酯类占 1.31%；主要成分有 *d*-柠檬烯（25.55%）、*γ*-萜品烯（10.48%）、*γ*-多烯（4.05%）、桧烯（3.66%）、3-蒈烯（3.25%）等。结果表明烯类成分是苦橙幼果区分于叶、花的特异性成分。



L.O，F.O 和 YF.O 分别为苦橙的叶、花和幼果的挥发油。下同。

L.O, F.O, and YF.O are the essential oils from leaves, flowers, and young fruits of *Citrus aurantium* var. *amara* in the table. The same below.

图 1 苦橙叶挥发油（**A**）、花挥发油（**B**）、 幼果挥发油（**C**）的 GC-MS 总离子流图

Fig.1 GC-MS total ion current chromatograms of L.O (**A**), F.O (**B**) and YF.O (**C**)

表 1　苦橙不同部位中的挥发性成分及相对含量

Table 1 Chemical compositions of essential oils from different parts of *Citrus aurantium* var. *amara*

编号 Number	保留时间 Retention time（min）	化合物 Compound	类别 Category	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content（%）		
					L.O	F.O	YF.O
1	6.18	3-蒈烯 3-carene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	7.39	5.35	3.25
2	6.35	2-甲基双环[4.3.0]非 1(6)-烯 2-methylbicyclo[4.3.0]non-1(6)-ene	烷烃类 Alkanes	$C_{10}H_{16}$	—	—	0.07
3	6.53	假枯烯 Pseudocumene	烯类 Alkenes	C_9H_{12}	0.05	0.08	—
4	6.60	桧烯 Sabinene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	2.61	4.36	3.66
5	6.76	*β*-蒎烯 *β*-pinene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	4.45	3.26	1.01
6	6.77	（2R，5S）-2-甲基-5-（丙-1-烯-2-基）-2-乙烯基四氢呋喃 (2R,5S)-2-methyl-5-(prop-1-en-2-yl)-2-vinyltetrahydrofuran	呋喃类 Furan	$C_{10}H_{16}O$	—	0.06	—
7	6.90	*α*-水芹烯 *α*-phellandrene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	—	—	0.15
8	6.90	伪柠檬烯 Pseudolimonene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	0.06	—	—
9	6.90	紫苏醇 Perilla alcohol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	0.16	—
10	7.08	4-乙基邻二甲苯 4-ethyl-1,2-dimethylbenzene	芳香烃类 Aromatic hydrocarbons	$C_{10}H_{14}$	0.06	—	—
11	7.13	*d*-柠檬烯 *d*-limonene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	2.06	16.15	25.55
12	7.40	*γ*-萜品烯 *γ*-terpinene	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	0.17	0.25	10.48
13	7.52	4-侧柏醇 Sabinene hydrate	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	—	—	0.06
14	7.53	2-(5-甲基-5-乙烯基四氢呋喃-2-基)丙 2 -基碳酸乙酯	酯类 Esters	$C_{13}H_{22}O$	0.30	1.28	1.00

		2-(5-methyl-5-vinyltetrahydrofuran-2-yl) propan-2-yl carbonate ethyl					
15	7.67	*α*-萜品烯 *α*-terpinen	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	1.57	0.85	2.81
16	7.77	异蒲勒醇 Isopulegol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	—	—	0.09
17	7.80	芳樟醇 Linalool	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	30.51	57.59	0.47
18	7.88	香芹醇 Carveol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	0.07	0.04
19	7.95	反式-薄荷基-2,8-二烯-1-醇 *trans*-Mentha-2,8-dien-1-ol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	—	0.05
20	7.96	反式-1-甲基-4-（1-甲基乙基）2-环己烯-1-醇 *trans*-1-methyl-4-(1-methylethyl)-2-Cyclohexen-1-ol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	—	—	0.07
21	8.01	2,4,6-十八碳烯-2,6-二甲基 2,4,6-octatriene-2,6-dimethyl	烯类 Alkenes	$C_{10}H_{16}$	0.41	0.19	—
22	8.06	(1S,4S)-1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)-环己-2-烯-1-醇 (1S, 4S) - 1-methyl-4 - (1-methylvinyl) - cyclohex-2-en-1-ol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	—	0.15
23	8.14	反式马鞭草醇 *trans*-verbenol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	—	0.34
24	8.20	异蒲勒醇 Isopropanol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	0.06	—	0.09
25	8.20	(3,3-二甲基环己基)-乙醛 (3,3-dimethylcyclohexyl) - acetaldehyde	醛类 Aldehyde	$C_{10}H_{16}O$	—	—	0.07
26	8.35	(+)-莰醇 Endo-borneol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	—	—	0.16
27	8.46	4-萜烯醇 4-terpinenol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	0.28	0.41	1.30
28	8.48	百里香酚 Thymol	酚类 Phenols	$C_{10}H_{14}O$	—	—	0.61
29	8.53	*α*-松油醇 *α*-terpineol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	14.78	3.32	0.89
30	8.61	顺式异紫堇醇 *Cis*-isocaryl alcohol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{16}O$	—	—	0.08
31	8.65	薄荷醇 Piperitol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	—	—	0.04
32	8.75	1-*p*-薄荷脑 1-*p*-menthen	醛类 Aldehyde	$C_{10}H_{16}O$	—	0.07	—
33	8.79	橙花醇 Neryl alcohol	醇类 Alcohols	$C_{10}H_{18}O$	8.56	2.56	—
34	8.94	右旋香芹酮 *D*-carvone	酮类 Ketones	$C_{10}H_{14}O$	—	—	0.13
35	9.00	甲酸芳樟酯 Linalool formate	酯类 Esters	$C_{11}H_{18}O$	11.60	—	—
36	9.12	柠檬醛 Citral	醛类 Aldehyde	$C_{10}H_{16}O$	0.10	0.08	—
37	9.23	香芹酚 Carvacrol	酚类 Phenols	$C_{10}H_{14}O$	—	—	0.39
38	9.27	3-甲基-4-异丙基酚 3-methyl-4-isopropylphenol	酚类 Phenols	$C_{10}H_{14}O$	—	—	1.02
39	9.31	吲哚 Indole	吲哚类 Indoles	C_8H_7N	—	0.38	—
40	9.44	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 2-methoxy-4-vinylphenol	酚类 Phenols	$C_9H_{10}O_2$	0.13	0.16	0.19
41	9.46	4-乙基-1,2-二甲氧基苯 4-ethyl-1,2-dimethoxy benzene	烃类 Alkanes	$C_{10}H_{14}O$	—	—	0.11
42	9.56	7-亚甲基-2,4,4-三甲基-2-乙烯基-双环[4.3.0]壬烷	烃类 Alkanes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.06

		7-Methylene-2,4,4-Trimethyl-2-Vinyl-Bicyclo[4.3.0]Nonane					
43	9.64	δ-榄香烯 δ-elemene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	1.13
44	9.64	4-异亚丙基-1-乙烯-*O*-薄荷-8-烯 4-Isopropylidene-1-Vinyl-*O*-Menth-8-Ene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	0.19	—	—
45	9.66	氨茴酸甲酯 Methyl anthranilate	酯类 Esters	$C_8H_9NO_2$	—	0.25	—
46	9.68	α-乙酸萜品酯 α-terpinyl acetate	酯类 Esters	$C_{12}H_{20}O$	0.19	—	—
47	9.72	可巴烯 Copaene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.45
48	9.75	丙酸叶醇酯 Geranyl propionate	酯类 Esters	$C_{13}H_{22}O$	11.62	0.36	—
49	9.90	依兰烯 Ylangene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.11
50	9.97	双环[5.3.0]癸烷，2-亚甲基-5-（1-甲基乙烯基）-8-甲基 Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	1.70
51	10.03	茉莉酮 Jasmone	酮类 Ketones	$C_{11}H_{16}O$	—	0.09	—
52	10.05	(-)-α-雪松烯 (-)-α-cedrene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.09
53	10.23	γ-多烯 γ-muurolene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	4.05
54	10.25	石竹烯 Caryophyllene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	0.74	0.09	2.38
55	10.35	赛斯奎沙宾 Sesquisabinen	烷烃类 Alkanes	$C_{15}H_{24}$	—	0.07	—
56	10.47	1,5,9,9-四甲基-1,4,7-环己烯 1,5,9,9- tetramethyl-1,4,7,-cycloundecatriene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	0.15	—	—
57	10.60	(EZ)-β-紫罗兰酮 (EZ)-β-ionone	酮类 Ketones	$C_{13}H_{22}O$	0.05	—	—
58	10.66	α-蒎烯 α-copaene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	6.70
59	10.73	（1S, 2E, 6E, 10R）-3,7,11,11-四甲基双环[8.1.0]十一碳二烯 (1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	0.38	0.08	3.74
60	10.86	δ-卡宾烯 δ-cadinene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	0.08	—	2.49
61	10.94	长叶蒎烯 (+)-α-longipinene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.25
62	10.97	环苜蓿烯 Cyclosativene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	1.54
63	10.99	selina-3,7（11）-二烯 Selina-3,7(11)-diene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.16
64	11.04	喇叭烯 Varidiflorene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.92
65	11.04	反式橙花叔醇 *trans*-nerolidol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	0.21	0.69	—
66	11.16	大根香叶烯 B Germacrene B	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	1.26
67	11.23	β-桉叶醇 β-Eucalyptol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{24}O$	0.25	—	1.67
68	11.28	桉油烯醇 Spathulrnol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{24}O$	0.19	—	1.99
69	11.35	蓝桉醇 Globulol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	—	0.74
70	11.38	愈创木醇 Guaiol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	—	0.25
71	11.40	白千层醇 Viridiflorol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	0.05	—	—
72	11.51	4,5,10-大根香叶三烯-1-醇 4,5,10-germacratrien-1-ol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{24}O$	—	—	1.02
73	11.54	6-芹子烯-4α-醇	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	—	1.09

		6-selin-en-4α-ol					
74	11.63	月桂烯醇 Junenol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	—	2.81
75	11.67	10s, 11s-雪松-3(12), 4 -二烯 10s,11s-himachala-3(12),4-diene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.31
76	11.70	τ-杜松醇 τ-cadinol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	0.19	—	1.39
77	11.80	白菖醇 Shyobunol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	0.09	—
78	11.84	τ-木糖醇 τ-muurolol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	0.12	—	2.21
79	11.89	十氢二甲基甲乙烯基萘酚 Decahydrodimethyl methyl vinyl naphthol	酚类 Phenols	$C_{15}H_{26}O$	—	—	1.89
80	11.95	γ-雪松烯 γ-himachalene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}$	—	—	0.42
81	12.22	法尼醇 Farnesyl alcohol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{26}O$	—	0.81	—
82	12.22	杜松樟脑 Juniper camphor	萜类 Terpenoids	$C_{15}H_{26}O$	—	—	0.45
83	12.37	6 -异丙烯基-4,8α-二甲基-1,2,3,5,6,7,8,8 a-八氢萘-2 -醇 6-isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{24}O$	—	—	0.09
84	12.55	（1aR, 4aS, 8aS）-4a，8,8-三甲基-1,1a，4,4a，5,6,7,8-八氢环丙烷[d]萘-2-碳醛 (1aR,4aS,8aS)-4a,8,8-trimethyl-1,1a,4,4a,5,6,7,8-octahydrocyclopropa[d]naphthalene-2-carbaldehyde	醛类 Aldehyde	$C_{15}H_{22}O$	—	—	0.04
85	12.69	依兰醇 Ylangenol	醇类 Alcohols	$C_{15}H_{24}O$	—	—	0.05
86	12.84	7R，8R-8-羟基-4-亚异丙基-7-甲基双环[5.3.1]十一烯-1-烯 7R,8R-8-hydroxy-4-isopropylidene-7-methyl bicyclo[5.3.1]undec-1-ene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}O$	—	—	0.20
87	13.13	14-羟基-δ-卡丁烯 14-hydroxy-δ-cadinene	烯类 Alkenes	$C_{15}H_{24}O$	—	—	0.10
88	14.47	十六酸甲酯 Methyl palmitate	酯类 Esters	$C_{17}H_{34}O$	—	0.07	0.10
89	15.21	二丁脂 Dibutyl phthalate	酯类 Esters	$C_{16}H_{22}O$	—	—	0.04
90	15.87	西柏烯 Thunbergen	烯类 Alkenes	$C_{20}H_{32}$	—	0.08	—
91	17.97	亚油酸甲酯 Methyl linoleate	酯类 Esters	$C_{19}H_{34}O$	—	—	0.09
92	18.15	亚麻酸甲酯 Methyl linoleate	酯类 Esters	$C_{19}H_{32}O$	—	—	0.08
93	18.45	叶绿醇 Chlorophyll	醇类 Alcohols	$C_{20}H_{40}O$	0.17	—	0.07
94	19.96	亚油酸乙酯 Ethyl linoleate	酯类 Esters	$C_{20}H_{36}O$	—	0.06	—

注：表中 L.O，F.O 和 YF.O 分别为苦橙的叶、花和幼果的挥发油。下同。

Note: The L.O, F.O, and YF.O are the essential oils from leaves, flowers, and young fruits of *Citrus aurantium* var. *amara* in the table. The same below.

2.2 体外抗氧化活性

2.2.1 ABTS 自由基清除率

ABTS 在 734 nm 波长处有最强吸收峰，而当其与抗氧化剂结合后，两者反应能使 ABTS 溶液本身的蓝绿色褪去，且其褪色程度与抗氧化剂成定量关系。由图 2 可知，BHT 和苦橙不同部位挥发油对 ABTS 自由基的清除率均随着浓度的增大而逐步增强。当苦橙叶挥发油浓度达到 30 mg·mL^{-1} 时，清除率可达到 99.00%以上，表现出较强的抗氧化能力。当苦橙花

挥发油浓度达到 20 mg·mL^{-1} 时，对 ABTS 的清除率可达到 99.52%。苦橙果挥发油浓度达到 15 mg·mL^{-1} 时，苦橙果挥发油对 ABTS 的清除率可达到 100.0%。而幼果、花、叶的 IC_{50} 值分别为 2.6、5.1、8.2 mg·mL^{-1}，BHT 为 0.1 mg·mL^{-1}。幼果的清除 ABTS 自由基能力优于花和叶。

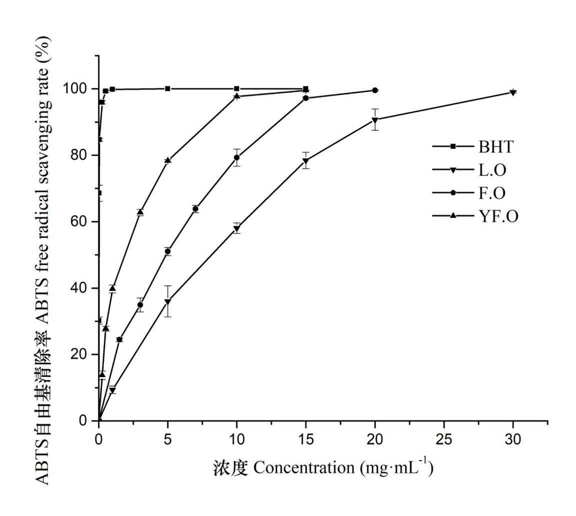


图 2 苦橙不同部位挥发油对 ABTS 自由基的清除率

Fig.2 Free radical scavenging rate of the essential oils from different parts on ABTS

2.2.2 DPPH 自由基清除

DPPH 自由基本身存在单电子，在 517 nm 波长处有最大吸收，当其醇溶液与抗氧化剂反应时，抗氧化剂可以和孤对电子配对使得吸收逐渐下降，甚至褪色消失，其吸光度下降程度与其接受的电子数量成定量关系。

由图 3 可知，随着 BHT 及苦橙挥发油浓度的增大，其对 DPPH 自由基的清除能力不断增强。当苦橙叶挥发油浓度达到 30 mg·mL^{-1} 时，其对 DPPH 自由基的清除率可达到 92.8%，与阳性组 BHT 的清除率基本达到相同水平，且继续增大浓度，清除率基本保持不变。当苦橙花挥发油浓度小于 20 mg·mL^{-1} 时，其对 DPPH 自由基的清除能力均小于阳性组 BHT，而当浓度大于 20 mg·mL^{-1} 时，苦橙花挥发油对 DPPH 自由基的清除率大于 BHT 对 DPPH 自由基的清除率，且最高清除率达到 95.24%。苦橙果挥发油对 DPPH 自由基的清除率始终低于 BHT，当浓度达到 10 mg·mL^{-1} 时，苦橙果挥发油对 DPPH 的清除率达到 86.92%，继续增大浓度，清除率基本保持不变。而幼果、花、叶的 IC_{50} 值分别为 2.7、4.3、5.0 mg·mL^{-1}，BHT 为 0.1 mg·mL^{-1}。幼果的清除 DPPH 自由基能力优于花和叶。

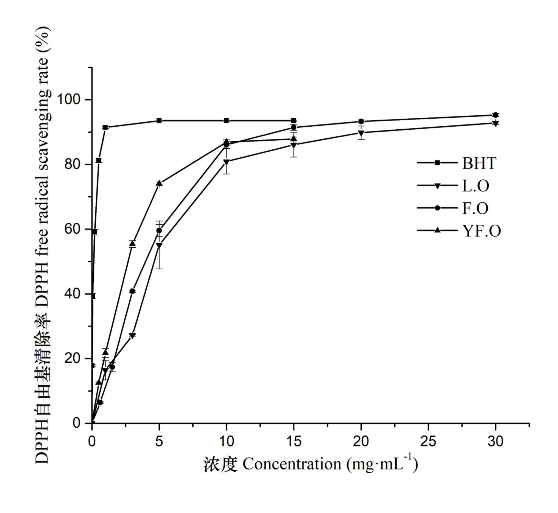


图 3 苦橙不同部位挥发油对 DPPH 自由基的清除率

Fig.3 Free radical scavenging rate of the essential oils from different parts on DPPH

2.3 抗菌活性

由表 2 可知，3 种挥发油对所有被测细菌均表现出一定的抗菌活性，特别是对抑菌圈直径为（15.2～22.7）mm 的大肠杆菌有一定的抗菌活性。此外，苦橙花和苦橙果对被试菌有较强的抗菌活性，这可归因于 *d*-柠檬烯的存在，其相对含量分别为 16.15%和 25.55%。3 种挥发油对被试菌的 MIC 值不同，大肠杆菌对挥发油更敏感。苦橙花的 MIC 值在 1~32 μg·mL^{-1} 范围内，苦橙果的 MIC 值为 8~16 μg·mL^{-1}。苦橙花挥发油的抗菌活性与之前关于橙花油的报告一致。

表 2 3 种挥发油的抗菌活性

Table 2 Antimicrobial activities of three essential oils

微生物菌株 Microbial strain	抑制区直径 Inhibition zone diameter (mm)				最小抑制浓度 Minimum inhibition concentration (μg ·mL^{-1})			
	L.O	F.O	YF.O	庆大霉素 Gentamicin	L.O	F.O	YF.O	庆大霉素 Gentamicin
大肠杆菌 *Escherichia coli*	15.2±0.4	22.7±0.3	19.5±0.6	22.6±0.8	16	1	8	0.25
金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*	8.5±0.2	10.1±0.4	13.2±0.4	40.5±0.9	＞32	＞32	16	0.5
铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*	12.0±0.5	15.6±0.7	16.4±0.3	31.3±0.2	＞32	16	16	0.5

3 讨论与结论

常见的挥发油提取方法有水蒸气蒸馏法、超临界流体萃取法、超声波辅助萃取法等。超临界流体萃取法虽然能够提升挥发油的提取率，但从经济效益、设备要求等多方面综合考虑，水蒸气蒸馏法更适用于工业生产（孙吴倩等，2022）。本研究采用水蒸气蒸馏法提取苦橙叶、花及其幼果的挥发油，应用气相色谱-质谱（GC-MS）联用技术对其化学成分进行定性定量分析。结果表明苦橙叶、花和幼果的挥发油单次提取率为 0.95%、0.27%和 0.34%。从得率来看，苦橙叶挥发油含量较高，易于获取，为可持续利用资源。而苦橙三个部位挥发油的化学成分种类与含量均存在一定差异，也正是这些香气成分及含量的不同，从而形成了各自的特性：苦橙叶挥发油呈微黄绿色油状，清香轻飘，主要成分有芳樟醇（30.51%）、*α*-松油醇（14.78%）、甲酸芳樟酯（11.60%）、橙花醇（8.56%）、3-蒈烯（7.39%）等；苦橙花挥发油呈无色透明油状，花香扑鼻，主要成分有芳樟醇（57.59%）、*d*-柠檬烯（16.15%）、3-蒈烯（5.35%）、*α*-松油醇（3.32%）、*β*-蒎烯（3.26%）等；苦橙幼果挥发油呈黄绿色油状物，香味浓郁，主要成分有 *d*-柠檬烯（25.55%）、*γ*-萜品烯（10.48%）、*γ*-多烯（4.05%）、桧烯（3.66%）、3-蒈烯（3.25%）等。

董雪等（2022）对苦橙花挥发油化学成分分析发现其主要的化合物为醇类和萜烯类，而叶一丹等（2019）对苦橙叶挥发油化学成分研究发现其含酯类和醇类物质为主，与本研究结果一致，另外本研究发现苦橙幼果中萜烯类成分最多，这是有异于叶和花的地方，可能原因是植株在生长发育过程中的代谢产物转化导致。

药用植物不同部位的生物学活性具有显著性差异的现象已有前人的研究结果得到佐证，李慧敏等（2022）研究发现北柴胡不同部位总黄酮含量与抗氧化活性从高到低分别为花、叶>茎>根。查雨锋等（2022）研究也表明三七根提取物对改善氧化损伤的作用优于茎、叶、花提取物。此外也有研究对冷饭团、丁香、木蝴蝶的不同部位进行成分与活性比较（杨艳和高渐飞，2018；左遨勋等，2022；李慧敏等，2022），了解其成分与活性差异有助于明确物质在植株中转运和积累机制。本研究结果表明苦橙不同部位挥发油对 ABTS 自由基和 DPPH 自由基均有较强的清除能力，幼果挥发油成分主要为萜烯类化合物，其抗氧化活性较优于叶和花，大部分芸香科挥发油对葡萄球菌、大肠杆菌、伤寒杆菌和枯草芽孢杆菌的生长均表现出不同程度的抑制活性（刘巧等，2019），本研究中幼果挥发油表现出的抗菌活性也较优于叶，可将幼果作为苦橙挥发油提取原料用于功效产品研发，其功效等级高于叶、花，但并无显著性差异，也可用叶、花作为苦橙挥发油提取原料以实现苦橙资源的综合开发利用。

参考文献：

ALI B, AL-WABEL NA, SHAMS S, et al., 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 5(8): 601-611.

CHEN LY, CUI ZH, 2006. Research Progress on antibacterial activity of plant essential oils[J]. Heilongjiang Med J, 19(3):197-198. [陈丽艳，崔志恒，2006. 植物精油抗菌活性的研究进展[J]. 黑龙江医药, 19(3):197-198.]

CHOI SY, KANG P, LEE HS, et al., 2014. Effects of inhalation of essential oil of *Citrus aurantium* L. var. *amara* on menopausal symptoms, stress, and estrogen in postmenopausal women: a randomized controlled trial[J]. Evid Based Complement Altern Med, 2014: 796518.

DONG X, LIU X, XIAO RX, et al., 2022. Chemical constituents of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers and its *in vitro* activities[J]. J Qingdao Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 43(3): 40-46. [董雪，刘霞，肖瑞欣，等，2022. 苦橙花精油化学成分分析及其体外活性[J]. 青岛科技大学学报（自然科学版），43(3): 40-46.]

FAN R, 2011. Composition and antioxidant activity of the Citrus maxima peel essential oils obtained by three different extraction methods[D]. Guangzhou: South China University of Technology: 14-22.[樊荣，2011. 柚皮精油的提取分析及活性研究[D]. 广州: 华南理工大学: 14-22.]

HAJ AMMAR A, BOUAJILA J, LEBRIHI A, et al., 2012. Chemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of *Citrus aurantium* L. flowers essential oil (Neroli oil)[J]. Pak J Biol Sci, 15(21): 1034-1040.

HUANG SS, HOU PJ, LI XL, et al., 2016. Analysis of volatile oil compounds of *Citrus bigarradia* V. by supercritical fluid[J]. Hubei Agric Sci, 55(12): 3182-3184. [黄善松，侯鹏娟，李小兰，等，2016. 超临界提取苦橙精油的成分分析[J]. 湖北农业科学，55(12): 3182-3184.]

JING H, ZUO JF, 2005. Pharmacological research progress of volatile oil[J]. NW Pharmaceutical J, 20(2): 97-98. [靖会，佐建锋，2005. 挥发油的药理研究进展[J]. 西北药学杂志，20(2): 97-98.]

KONG YT, HE H, AN FP, et al., 2021. Comparative study on antioxidant capacity of *Radix pseudostellariae* extracts[J]. Food Res Dev, 42(19): 28-35. [孔钰婷，何洪，安凤平，等，2021. 太子参提取物抗氧化能力的比较研究[J]. 食品研究与开发，42(19): 28-35.]

LI HM, GAO Y, SHAO XF, et al., 2022. Study on total flavonoids content and comparison of

antioxidant activity in different parts of *Bupleurum chinense* DC. from different provenances[J]. Chin Food Add, 33(4): 211-217. [李慧敏，高月，邵雪飞，等，2022. 柴胡不同部位总黄酮含量及抗氧化活性比较研究[J]. 中国食品添加剂，33(4): 211-217.]

LIU Q, ZHONG LY, ZENG JH, et al., 2020. Study on the antibacterial activity of essential oils from seven species in the Rutaceae family[J]. Chin Food Add, 31(5): 37-41. [刘巧，钟灵允，曾佳恒，等，2020. 7 种芸香科植物精油抑菌活性的研究[J]. 中国食品添加剂，31(5): 37-41.]

ROTA MC, HERRERA A, MARTÍNEZ RM, et al., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils[J]. Food Control, 19(7): 681–687.

STOHS SJ, 2017. Safety, efficacy, and mechanistic studies regarding *Citrus aurantium* (bitter orange) extract and p-synephrine[J]. Phytother Res, 31: 1463-1474.

SUN WQ, ZHANG XC, XIN XD, et al., 2022. Comparative study on extraction of volatile oil from *Artemisiae argyi* Folium by steam distillation and water extraction coupling rectification[J]. Acad J Shanghai Univ Trad Chin Med, 36(1): 27-32. [孙吴倩，张秀芳，忻晓东，等，2022. 水蒸气蒸馏法和提取-共沸精馏耦合技术提取艾叶挥发油比较研究[J].上海中医药大学学报，36(1): 27-32.]

SUNTAR I, KHAN H, PATEL S, et al., 2018. An overview on *Citrus aurantium* L.: its functions as food ingredient and therapeutic agent[J]. Oxid Med Cell Long, 2018:7864269.

WANG DM, CHEN XF, MAI LW, et al., 2021. Study on the relationship between antioxidant capacity and total flavonoids contents of cassava leaves[J]. Food Res Dev, 42(2):37-43. [王定美，陈新富，麦力文，等，2021. 木薯叶抗氧化能力与总黄酮含量及其关系研究[J]. 食品研究与开发，42(2): 37-43.]

WEI Q, TANG LJ, LOU XY, et al., 2022. GC-MS analysis of constituents of volatile oil in different parts of *Vitex negundo* var. *heterophylla*[J]. Sci Technol Food Ind, 43(12): 310-316. [魏婧，唐丽杰，娄晓月，等，2022. 荆条不同部位挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 食品工业科技，43(12): 310-316.]

YANG Y, GAO JF, 2018. Volatile components and their antioxidant activities in different parts of *Kadsura coccinea*[J]. Guihaia, 38(7): 943-952.[杨艳，高渐飞，2018. 冷饭团不同部位挥发性成分及抗氧化活性分析[J]. 广西植物，38(7): 943-952.]

YE YD, ZHANG N, LI YH, et al., 2019. Chemical composition and anti-inflammatory effect of essential oil from leaves of *Citrus aurantium* L. [J]. Nat Prod Res Dev, 31(5): 760-765. [叶一丹，张楠，李玉红，等, 2019. 苦橙叶精油化学成分及抗炎作用研究[J]. 天然产物研究与开发，31(5): 760-765.]

ZHA YF, ZHAN Y, LI T, et al., 2022.Study on antioxidant effect of extracts from different parts of sanqi(Radix Notoginseng) *in vitro*[J]. Acta Chin Med, 37(1):142-148. [查雨锋，詹易，李婷，等，2022. 三七不同部位提取物体外抗氧化功效研究[J]. 中医学报，37(1): 142-148.]

ZHANG HY, GAO Y, LAI PX, 2017. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil from *Premna microphylla* Turczaninow[J]. Molecules, 22(3):381.

ZUO AX, LIU JG, GAO YM, et al., 2022. GC-MS analysis and comparison of antioxidant activities of volatile oils from different parts of *Eugenia caryophyllata* Thunb[J]. Food Res Dev, 43(8): 146-151. [左遨勋，刘积光，高玉梅，等，2022. 丁香不同部位挥发油的 GC-MS 成分分析和抗氧化活性比较[J]. 食品研究与开发，43(8): 146-151.]